



Trabajo Fin de Grado

Departamento de Farmacología y Fisiología

Universidad de Zaragoza

EFFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO EN LA FLUIDEZ DE MEMBRANAS
MITOCONDRIALES HEPÁTICAS DE RATONES CON SENESCENCIA
ACELERADA



Universidad
Zaragoza

6º Grado Medicina 2014/2015

Laura Mª Pradal Jarne

INDICE

<i>Abstract/Resumen</i>	4
<i>Introducción</i>	
• <i>Concepto de envejecimiento</i>	5
• <i>Teorías del envejecimiento</i>	5
• <i>Envejecimiento y membranas celulares</i>	7
• <i>Concepto de fluidez de membrana</i>	8
• Métodos de estudio de la fluidez de membrana	15
Objetivos	16
Material y métodos	17
○ Material	
• Animales	17
• Material de laboratorio	17
○ Métodos analíticos	20
• Aislamiento de membranas celulares y mitocondriales	20
• Determinación de la concentración de proteínas	21
• Valoración de la fluidez de membrana	23
• Análisis estadísticos	24
Resultados	
• Fluidez en la membrana celular	25
• Fluidez en la membrana mitocondrial	25
Discusión	26
Conclusión	30

Effects of aging on the fluidity of hepatic mitochondrial membranes of mice with accelerated senescence.

Abstract: It is an accepted fact that biological membranes require a fluid state in order to develop their functions properly. Thus, knowing the structure of the bilayer and its physical properties is the basis to explain a multitude of related processes to the membrane.

The decreases of fluidity in the membrane, observed during ageing, are of special interest. An increase in the concentration of cholesterol, and free radicals activity in the membrane, both are among their causes, bringing about the lipid peroxidation phenomenon. So, during ageing, disequilibrium between the creation and the purification of free radicals can be described.

It is carried out a study comparing the fluidity of plasma membranes and hepatic mitochondrial membranes in SAM (senescence accelerated mice) and their control mice to check ageing effects in their membranes by using the 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene-*p*-toluene-sulfonate (TMA-DPH) fluorescence method.

Keywords: ageing, membrane fluidity,

Efectos del envejecimiento en la fluidez de membranas mitocondriales hepáticas de ratones con senescencia acelerada.

Resumen: Es un hecho aceptado que las membranas biológicas requieren un estado fluido para desarrollar sus funciones correctamente. Por ello, conocer la estructura y las propiedades físicas de la bicapa constituyen la base para explicar multitud de procesos relacionados con la membrana.

De especial interés son los descensos de fluidez de membrana observados durante el envejecimiento. Entre sus causas se incluyen el aumento de la concentración de colesterol y la acción de los radicales libres sobre la membrana, dando lugar al fenómeno de la peroxidación lipídica. Así durante el envejecimiento se puede describir un desequilibrio entre formación y depuración de radicales libres. Se realiza un estudio comparando la fluidez de membranas plasmáticas y membranas mitocondriales hepáticas de ratones con senescencia acelerada y sus ratones controles para comprobar el efecto del envejecimiento en sus membranas con el método de fluorescencia de 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1, 3,5-hexatrieno-*p*-tolueno-sulfonato (TMA-DPH).

Palabras clave: envejecimiento; fluidez de membrana.

INTRODUCCIÓN

Concepto de envejecimiento

No existe una definición precisa y exhaustiva del término envejecimiento, pero todas las definiciones hacen referencia al progresivo decaimiento funcional del organismo

Denham Harman postuló que el envejecimiento es un proceso multifactorial, común a todos los seres vivos y lo define como el resultado de la acumulación de cambios en el organismo con el paso del tiempo que conlleva a un declive funcional progresivo de todos los sistemas y aparatos del organismo que conduce a un incremento en la probabilidad de enfermedad y muerte del individuo.

Es un proceso de gran heterogeneidad. Como características que lo definen, encontramos que es un proceso universal, irreversible y deletéreo, ya que lleva a una progresiva pérdida de función que resulta ser heterogénea, individual e intrínseca. Podemos encontrar que cada especie tiene una velocidad característica de envejecer. Dentro de la especie, la pérdida funcional también varía de un sujeto a otro; incluso dentro de un mismo individuo, algunos órganos envejecen de forma más temprana a otros, como le ocurre al sistema nervioso.

En la actualidad, su estudio es un objetivo prioritario de la investigación científica biomédica ya que el envejecimiento es un proceso que tiene importantes connotaciones, las cuáles están adquiriendo en los últimos años una especial relevancia para conocer sus causas y mecanismos fisiopatológicos con la finalidad de retrasar su evolución y sobre todo para reducir la incidencia y gravedad de las patologías que se asocian a él. Su estudio ha originado una gran cantidad de teorías.

Teorías del envejecimiento

Por la naturaleza multicausal del envejecimiento resulta probable que no sólo un único mecanismo sea responsable de ello.

Se han propuesto muchas teorías para explicar las modificaciones naturales asociadas al envejecimiento. Goldstein y colaboradores las han dividido en dos grandes categorías: estocásticas

Las teorías estocásticas, postulan que los cambios en el envejecimiento son consecuencia de la acumulación de daños aleatorios en moléculas provocados por daños ambientales y que éstas se podrían estudiar recurriendo a cálculos probabilísticos

Las segundas, son las de los cambios programados o teorías deterministas, éstas, sostienen que las alteraciones de la edad, están programadas genéticamente, es decir, que el envejecimiento está predeterminado y es donde se agrupan fenómenos que se describen mediante un número limitado de variables conocidas, que evolucionan de una manera exacta a la reproducida en el estudio, sin recurrir a ningún cálculo probabilístico (teorías no estocásticas)

De entre todas las teorías propuestas, la más aceptada en la actualidad es la teoría de los radicales libres propuesta en 1956 por Harman que pertenece a las teorías estocásticas. Esta teoría postula que el envejecimiento se produce por el acúmulo de lesiones moleculares provocadas por reacciones de los radicales libres en la célula a lo largo de la vida

Entre los productos secundarios del metabolismo oxidativo, se forman radicales libres tóxicos que son moléculas que contienen uno o varios electrones desapareados en su orbital más externo (Fridovich, 1978), y son altamente reactivos, pueden oxidar ácidos nucleicos, proteínas y lípidos conduciendo a una pérdida en su función con el paso del tiempo.

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre los factores prooxidantes y antioxidantes, siendo de predominio los primeros. (Sies y Mehlforn, 1986)

En el envejecimiento enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa están disminuidas (Biesalski, 2002). Así los sistemas antioxidantes son incapaces de contrarrestar el ambiente oxidante y se producen daños en los tejidos.

Posteriormente Miquel y colaboradores focalizaron la teoría del estrés oxidativo en el genoma mitocondrial. Esta teoría postula que el envejecimiento es el resultado del daño causado por las especies reactivas de oxígeno en el genoma mitocondrial de las células postmitóticas. (Miquel, 1980).

Las mitocondrias desarrollan un papel primordial en el metabolismo celular y son las principales fuentes generadoras de radicales libres en el envejecimiento (Miquel, 1992). Una

alteración en la función mitocondrial conlleva a un exceso de formación de especies reactivas de oxígeno que pueden causar alteraciones estructurales y funcionales en todos los tipos de biomoléculas. Este suceso implica a las lesiones oxidativas en la fisiopatología del envejecimiento y de las enfermedades degenerativas (Matsugo y cols., 2000). Además, durante el envejecimiento la membrana mitocondrial sufre una disminución de los niveles de ácido linoleico y un incremento de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, los cuáles son fácilmente oxidables (Castelluccio y cols., 1994)

Envejecimiento y membranas celulares

Las membranas celulares son muy susceptibles al ataque de los radicales libres. Éstos pueden interactuar con los lípidos y proteínas de la membrana, provocando alteraciones estructurales y funcionales. Las colas de ácido graso y aún más los ácidos grasos poliinsaturados que integran los fosfolípidos son muy sensibles al ataque del radical libre. (Rice- Evans y Burdon, 1993; Gutteridge, 1995)

Esta interacción entre el resto acilo y un radical libre, recibe el nombre de peroxidación lipídica. Este proceso es iniciado por un mecanismo de reacción en cadena de un radical libre. Al igual que cualquier reacción con radicales sucede en tres pasos fundamentales. La iniciación es el paso donde se produce el radical de ácido graso. Los iniciadores en células vivas más notables son especies reactivas del oxígeno, tales como $\text{OH}\cdot$, el cual combina con un hidrógeno para dar lugar a agua y a un ácido graso radical. En la propagación, el ácido graso radical no es una molécula muy estable, de modo que reacciona rápidamente con oxígeno molecular, creando de este modo un ácido graso peroxil radical. El mismo, también es una especie muy inestable por lo cual reacciona con otro ácido graso dando lugar a un ácido graso radical diferente y a un peróxido lípido o un peróxido cíclico si ha reaccionado consigo mismo. Este ciclo continúa ya que el nuevo ácido graso radical se comporta de la misma manera. En la terminación, cuando un radical reacciona, siempre produce otro radical, es por ello que se trata de un mecanismo de reacción en cadena. La reacción radical se detendrá ante la presencia de antioxidantes o por el agotamiento de sustrato. (Figura 1)

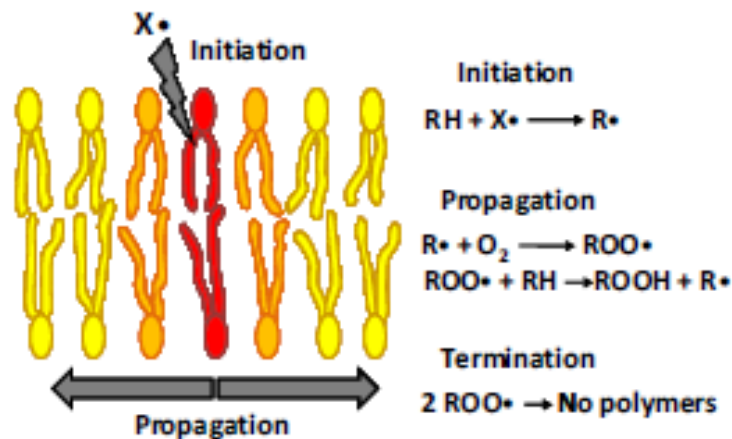


Figura 1. Proceso de peroxidación lipídica. Un radical libre ($X\bullet$) reacciona con un átomo de hidrogeno de un ácido graso poliinsaturado (RH) dando la formación de un conjugado dieno que rápidamente reacciona con una molécula de oxígeno, formando un nuevo radical peróxido ($ROO\bullet$). Este $ROO\bullet$ reacciona con otro hidrógeno de un segundo ácido graso poliinsaturado, formando un hidroperóxido lipídico y un nuevo conjugado dieno. El proceso sólo se detiene ante la presencia de antioxidantes o por agotamiento del sustrato.

Los productos finales del proceso son muy numerosos y entre ellos destaca el malondialdehído y los 4-hidroxi-alquelantes. Por tanto, sus concentraciones son buenos indicadores en la valoración del grado de peroxidación de los lípidos de las membranas biológicas (Janero, 1990)

Así, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y las cardiopatías pueden estar relacionadas con las alteraciones del ADN mitocondrial dañado por los radicales libres producidos en la mitocondria

Concepto de fluidez de membrana

El esquema estático y ordenado de la membrana celular de Davson y Danielli, como una bicapa lipídica integrada mayoritariamente por fosfolípidos anfipáticos ubicados en las superficie de la membrana y en contacto con agua extra e intracelular y las “colas” de ácidos grasos hidrófobas de ambas capas orientadas hacia el centro de la membrana fue superado en 1972 por el modelo dinámico de mosaico- fluido, de Singer y Nicolson, que aportó dos nuevos conceptos de la estructura de las membranas biológicas. Primero, la existencia de proteínas que atraviesan toda la bicapa, denominadas integrales y por ello difíciles de separar incluso con tratamientos energéticos

de la membrana con detergentes, ácidos biliares o solventes orgánicos. Segundo, los lípidos y las proteínas de la membrana son estructuras dinámicas, con capacidad de difusión lateral y transversal respecto al plano de la membrana.

En la actualidad numerosas investigaciones tratan de dilucidar los tipos de movimientos de los lípidos y proteínas en la membrana así como las propiedades funcionales relacionadas con sus interacciones

Los movimientos pueden ser clasificados por la existencia o ausencia de desplazamiento neto de una molécula desde una posición inicial a otra final en la bicapa. Los movimientos sin desplazamiento neto incluyen flexión- extensión de las células respecto a las cabezas la rotación del fosfolípido sobre un teórico eje cabeza- cola. Los movimientos con desplazamiento neto engloban la difusión lateral de una molécula en los ejes del plano de la membrana los saltos de fosfolípidos de una hemicapa a otra. (Figura 2)

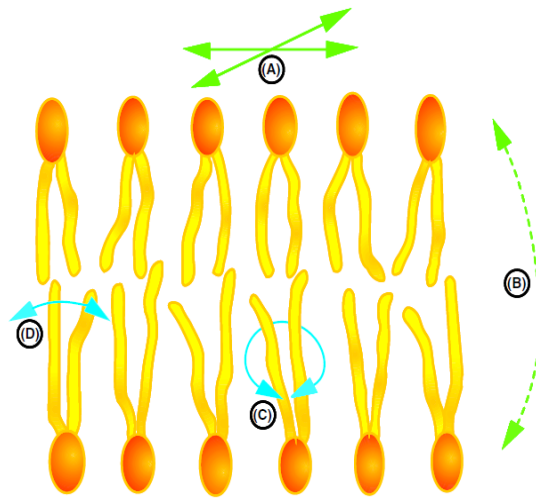


Fig.2.Movimientos de los fosfolípidos en la bicapa lipídica de una membrana celular. Las flechas verdes indican los que implican un desplazamiento neto de la molécula entre dos posiciones en el plano de la membrana y las azules los movimientos sin desplazamiento neto por la membrana. A. Flip-flop. B. Difusión lateral C. Rotación D. Flexión.

- Factores que modulan la fluidez de membrana:

1) Estructura de su composición:

1a) El aumento de la concentración de colesterol, principal esteroide de células eucariotas, se considera el principal agente causante de rigidez.

Las moléculas de colesterol refuerzan el carácter de barrera permeable de la bicapa lipídica. Su estructura determina su localización en la membrana. El colesterol se sitúa intercalado entre los fosfolípidos, paralelo al eje cabeza-cola con la función alcohol de la posición C3 orientada hacia la región hidrofílica. Las interacciones electrostáticas entre los grupos hidroxilo y fosfato se han relacionado con la restricción de movimiento. (Figura 3)

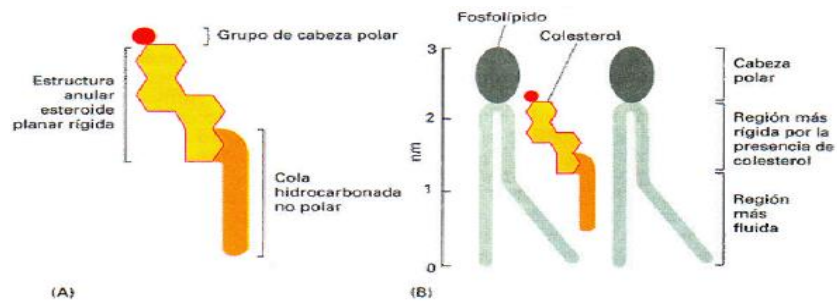
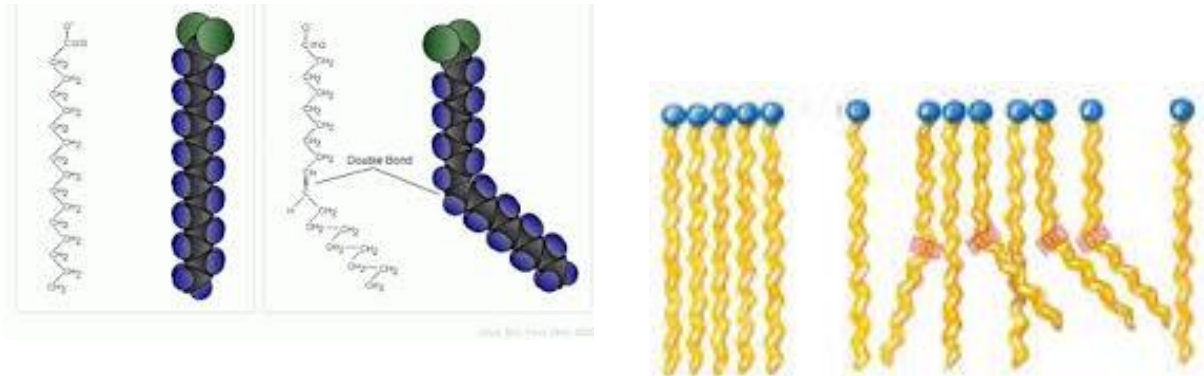


Figura 3. El colesterol aumenta la rigidez de las membranas celulares. A. Estructura del colesterol. B. Ubicación del colesterol entre los fosfolípidos en una bicapa lipídica.

1b) Otro factor limitante de movimiento es el grado de saturación de los restos acilo. En la bicapa lipídica, los lípidos más abundantes son los fosfolípidos y son moléculas anfipáticas, tienen un extremo lipofóbico y otro extremo hidrofóbico. Así se distingue una cabeza polar y dos colas hidrocarbonadas hidrofóbicas. Las colas suelen ser ácidos grasos y pueden tener diferente longitud. En general, una de las colas presenta uno o más dobles enlaces cis (insaturada) mientras que la otra no tiene dobles enlaces (saturada). Cada doble enlace cis genera una suave curvatura en la cadena. La formación de un doble enlace conlleva a un marcado aumento del volumen que ocupan los restos acilo y el resultado se refleja en un descenso de la viscosidad en la bicapa.

Las diferencias de longitud y grado de saturación entre las colas hidrocarbonadas son importantes porque afectan a la capacidad de las moléculas de los fosfolípidos para empaquetarse unas con otras, determinando la fluidez de la membrana.

Cuanto más cortos y más insaturados son los lípidos de membrana, más fluida es esta última, el grado de empaquetamiento es menor porque se reduce la interacción entre los grupos alquilo de los lípidos. Las cadenas largas saturadas muestran una mayor asociación entre sí y por tanto, son más rígidas. (Figura 4)



A)Ácido graso saturado

B)Ácido graso Insaturado

C)Ácidos grasos
saturadosMezcla de ácidos grasos saturados e
insaturados.

Figura 4. A. Palmitato como ejemplo de ácido graso saturado. B. Oleato como ejemplo de ácido graso insaturado. C La saturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos afecta a la fluidez de membrana. Se observa la disposición de los componentes de la membrana según su grado de saturación.

La relación entre los ácidos grasos saturados e insaturados así como la de colesterol y fosfolípidos se han utilizado como indicadores por su buena correlación con el nivel de fluidez de membrana.

2) Las proteínas de membrana son componentes de la membrana de muy baja compresibilidad. Su acción es aportar rigidez a la membrana, especialmente en el anillo de lípidos vecinos a la proteína. (Figura 5)

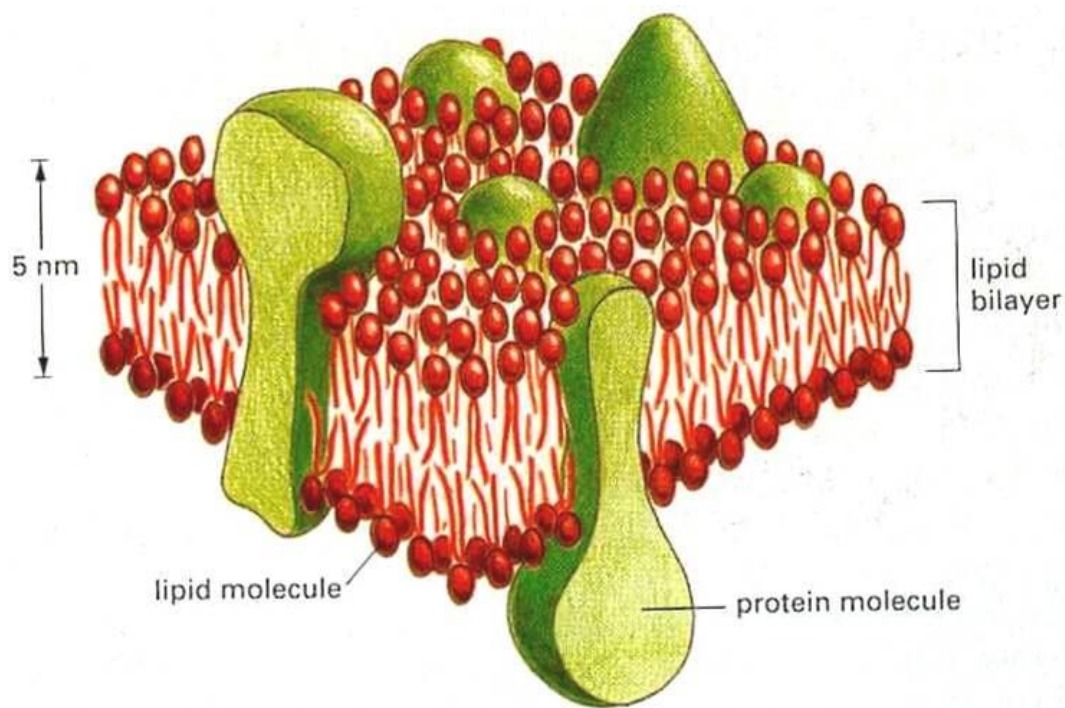


Figura 5. Estructura y composición de la membrana plasmática de la célula eucariota.

3) Factores físicos como la temperatura, el pH, los potenciales de membrana y la presión.

Respecto a la temperatura, en caso de las sintéticas, producidas a partir de un único tipo de fosfolípido, pasa de un estado líquido a un estado cristalino rígido en un punto de congelación característico, perdiendo pues sus propiedades de movimiento. Este cambio recibe el nombre de *transición de fase* y depende de la longitud y del grado de insaturación de las cadenas de los fosfolípidos para que la membrana se fusione. Si las cadenas hidrocarbonadas son cortas o tienen dobles enlaces cis (insaturadas), la temperatura a la que se congelan es más baja (la membrana resulta más difícil de congelar). (Figura 6)

Se explica porque, una longitud menor de la cadena, reduce la tendencia de las colas hidrocarbonadas a interactuar entre sí y los dobles enlaces cis producen pliegues en las cadenas hidrocarbonadas que dificultan su empaquetamiento, de forma que las membranas permanecen fluidas a temperaturas más bajas.

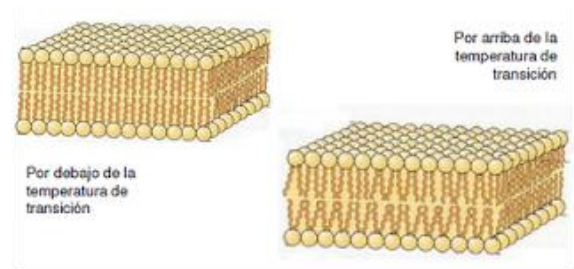


Figura 6. Efecto de la temperatura sobre el movimiento de los fosfolípidos, por debajo y por encima de la temperatura de transición, respectivamente.

Si las colas son cortas e insaturadas, esta temperatura será más baja y será más difícil cristalizar la membrana, al contrario que si las colas son alargadas y saturadas, éstas se cristalizan antes y la membrana pierde fluidez.

El colesterol tiende a hacer menos fluidas las bicapas lipídicas, pero a las elevadas concentraciones a las que se presenta en la mayoría de las membranas plasmáticas de las células también impide que las cadenas hidrocarbonadas se junten y cristalicen. Así pues el colesterol inhibe posibles transiciones de fase.

4) Agentes químicos como detergentes y en general todas las moléculas con propiedades anfipáticas: hormonas esteroideas relacionadas metabólicamente con el colesterol, anestésicos como el tiopental y algunas drogas psicotrópicas.

5) Asimetría de los lípidos de membrana.

Otra característica importante de los lípidos de membrana es que presentan una fuerte asimetría. Existen dos tipos de asimetría: una en la proporción de fosfolípidos entre una capa y otra de la bicapa lipídica y otra entre diferentes regiones de la membrana. Esta asimetría responde a una funcionalidad y a la biosíntesis de cada tipo de lípido.

5.1) Asimetría entre monocapas. (Figura 7)

La mayoría de los fosfolípidos cargados negativamente se sitúan en la cara interior (fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina) mientras que los fosfolípidos cargados positivamente como la fosfatidilcolina y la esfingomiélin se encuentran en la cara exterior. Este desajuste es una de las causas del potencial de membrana que se observa en las membranas celulares.

La asimetría de las membranas también contribuye a la señalización celular. Cada fosfolípido tiene su tarea y su posición es adecuada para realizar la función que le caracteriza.

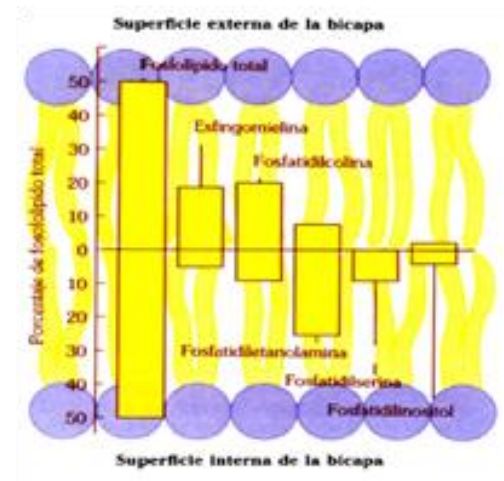


Figura 7. Distribución de fosfolípidos encontrados en la membrana externa y en la membrana interna de una membrana eucariota expresado en términos de porcentaje.

5.2) Asimetría por microdominios

La otra asimetría que se puede vislumbrar en las membranas es la diferencia de componentes por regiones de membrana. La membrana plasmática contiene microdominios enriquecidos en algún lípido como pueden ser esfingolípidos o colesterol, es decir, se observa que algunos lípidos se concentran en algunas zonas. Esta aglomeración se debe al gran tamaño de algunos esfingolípidos, que mantienen una fuerte interacción entre ellos, lo que crea unas zonas más gruesas que otras en la membrana plasmática. Estos conglomerados, llamados “lipid rafts”, (Figura 8). Son de gran ayuda para la transducción de señales por parte de proteínas receptoras que trabajarían conjuntamente.

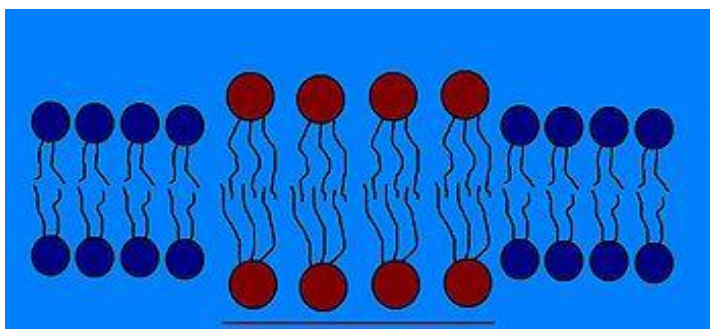


Figura 8. Balsa lipídica o acumulación lipídica. Microdominio de la membrana plasmática cuya fluidez es mucho menor a la de su entorno. Se encuentran enriquecidos en colesterol, fosfolípidos saturados y proteínas de membrana

6) Melatonina.

Tanto la melatonina de origen pineal, como la extrapineal disminuye con la edad, y este descenso está directamente relacionado con los cambios originados del envejecimiento. Al estar disminuida, facilita la aparición de signos de estrés oxidativo y como consecuencia de ello, más rigidez de membrana.

Así que se puede afirmar que la melatonina es un potente antioxidante sea por acción directa y/o indirecta, con importantes propiedades para actuar sobre la mitocondria y en consecuencia, protegerá al ADN mitocondrial, las membranas lipídicas y las proteínas mitocondriales del daño oxidativo. Lo que en conjunto va a tener una gran importancia fisiológica y se va a traducir en un aumento en los niveles de ATP (Martin y cols. 2002; López y cols. 2006a.) y por tanto la supervivencia de la célula.

7) Efectos del ejercicio físico en la fluidez de membranas

Es bien sabido que el ejercicio físico regular constituye una actividad preventiva y saludable (Blair y cols., 2001). No obstante, en las últimas décadas, numerosos trabajos de investigación han demostrado que la realización del ejercicio físico puede exacerbar el estrés oxidativo (Powers y Jackson, 2008)

8) Fluidez y enfermedades.

Existen estudios sin culminar acerca de las alteraciones de la fluidez de la membrana en algunos estados patológicos, especialmente aquellos que cursan con procesos crónicos y degenerativos. En este sentido, se describen aumentos y descensos de fluidez en membranas de células tumorales de diferentes extirpes y localizaciones, relacionando la fluidez de la membrana con la capacidad invasiva tumoral. Otras patologías en las que se describen modificaciones de la dinámica lipídica son: enfermedades metabólicas como la diabetes, algunas psicosis afectivas como la esquizofrenia, procesos relacionados con situaciones de isquemia y posterior reperusión de un tejido y la preeclampsia.

Método de estudio de la fluidez de las membranas

La técnica utilizada en este estudio para valorar la fluidez de membrana fue la espectroscopia de fluorescencia utilizando 1-(4-trimetilamoniofenil)-6-fenil-1,3,5-hexatrieno-*p*-tolueno-sulfonato (TMA-DPH) como marcador fluorescente.

El método se basa en la inclusión de esta molécula en las membranas, la cuál se intercala entre los fosfolípidos de la bicapa, reflejando de forma indirecta la dinámica lipídica, ya que al ser iluminado con el microscopio, emite fluorescencia (Zimmer y cols, 1993). (Figura 9)

Esta molécula tiene la ventaja frente a otros marcadores de presentar un extremo hidrófilo (TMA) y otro lipófilo (DPH), por lo que se puede comparar su comportamiento como un fosfolípido.

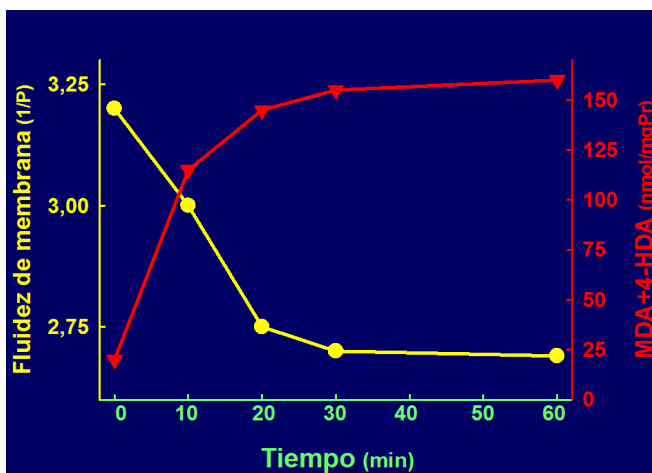


Figura 9. Interpretación de los resultados con TMA-DPH. Se observa que a menor fluidez de membrana se registran valores más altos en la espectroscopia de fluorescencia.

OBJETIVOS

1. Investigar las alteraciones en la fluidez de membranas celulares hepáticas de ratones con envejecimiento acelerado (senescence –accelerated mouse –prone 8, SAMP8) frente a los controles de la misma especie sin envejecimiento acelerado (senescence accelerated mouse resistant 1, SAMR1) a los 5 meses de edad.
2. Comparar las diferencias existentes en cuanto a los resultados de fluidez de membrana celular con la mitocondrial en los dos grupos de ratones.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

Animales

Se utilizaron en total 20 ratones (machos y hembras), la mitad de ellos con envejecimiento acelerado, SAMP8 (10) y sus controles SAMR1 (10) de la misma especie (AKR/J) pero sin envejecimiento acelerado.

Los animales se obtuvieron del Council for SAM Research, Kyoto, Japón, a través, de Harlan Ibérica SA (Barcelona, España).

Los ratones SAM (senescence accelerate mouse) presentan unos fenotipos diferentes según las cepas. La causalidad genética de su envejecimiento es compleja e implica varios genes no determinados. Los SAM se han desarrollado por selección fenotípica a partir de ratones de raza AKR/J basándose en los cambios observados en su envejecimiento. Se han obtenido nueve cepas de envejecimiento acelerado (SAMP) y tres resistentes al mismo (SAMR) que sirven como controles. Los ratones SAMP presentan amiloidosis, neoplasias, osteoporosis, debilidad, fallos respiratorios y auditivos, defectos en el aprendizaje y memoria, cataratas y atrofia cerebral. Sus fenotipos son distintos según cada cepa. Los ratones SAMP8 son un modelo reconocido de envejecimiento que desarrollan déficits de aprendizaje y memoria. Tienen cambios neuropatológicos como el depósito del péptido betaamiloide, hiperfosforilización de tau, deterioro de las espinas dendríticas y cambios neuroquímicos. Los cerebros de ratones SAMP8 padecen estrés oxidativo que se incrementa con la edad.

Entre las causas del envejecimiento acelerado en estos ratones destaca el elevado grado de estrés oxidativo debido a la disfunción mitocondrial (Mori y cols.1998; Hosokawa, 2002; Rodríguez y cols. 2007 y 2008).

Se estabularon en las instalaciones del Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, permaneciendo en una jaula, con la temperatura ambiental regulada automáticamente a 22 ± 1 °C y bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas, iniciando la fase de

luz a las 07:00 h y la fase oscura a las 19:00 h, con el fin de simular un horario de actividad máxima. Tuvieron disponibilidad de agua y alimentación *ad libitum* (dieta de mantenimiento para roedores, Harlan-Ibérica, tipo RMM).

Todas las manipulaciones animales y el procedimiento experimental se realizaron por las mañanas en una habitación termorregulada aislada. Todos los experimentos se realizaron cumpliendo estrictamente la normativa vigente europea (Directiva 86/609/CEE), española (Real Decreto 1201/2005) y autonómica (Ley 11/2003).

A la edad de 5 meses, se sacrificaron por decapitación. El hígado se obtuvo lo antes posible, se congeló de inmediatamente en nitrógeno líquido y fue almacenado a -80º hasta que se procedió al aislamiento de membranas y mitocondrias.

Material de laboratorio

El trabajo experimental se realizó en los laboratorios del grupo de investigación consolidado del Gobierno de Aragón “*Fisiología del envejecimiento y del estrés oxidativo*”, situados en el Área de Fisiología del Departamento de Farmacología y Fisiología, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza. Están equipados, entre otros, con el siguiente utillaje empleado en el transcurso de esta investigación:

- Agitadores: vórtex Velp Scientifica Zx3 y vórtex Heidolph REAX 2000.
- Balanzas de precisión Cobos CBH-300J y A-220 CB.
- Baño termostatzado con agitación Bunsen BTG-1.
- 2 centrífugas Beckman- Avanti 30TM, refrigeradas y equipadas con dos rotores: F1010 para 10 tubos de 10 mL, y F3602 para 36 tubos Eppendorf de 1,5 y 2 mL.
- Espectrofotómetro Beckman-Coulter DU800, con dos tipos de cubetas: desechables de plástico para medir en el rango visible, y de cuarzo para medir en el rango ultravioleta (UV).
- Espectroscopio de fluorescencia Perkin-Elmer LS-55, equipado con un accesorio de polarización con cubetas de cuarzo y un accesorio de microagitación de la muestra presente en la cubeta. Este aparato va acompañado de un baño recirculante Selecta

- Frigiterm.
- Homogeneizador de teflón acoplado a un rotor Heidolph RZR 2020.
- Homogeneizador Ultra-Turrax Janke & Kunkel T25.
- pHmetro Crison-micro pH 2001, equipado con sonda de temperatura.
- Pipetas de precisión, dos juegos: Gilson (P-20, P-200, P-1000 y P-5000) y Eppendorf (0,5-10, 10-100 y 100-1000 μ L).
- Pipeta multidispensadora BibbyStep con puntas Eppendorf de 2,5, 5 y 50 mL.
- Sistemas de agua de Millipore: destilada MilliRX y ultrapura MilliQ.
- Frigorífico con nevera (4 °C) y congelador (-20 °C) Liebherr Premium
- Ultracongelador (-80°C) Sanyo[®] MDF-U5386S.
- Máquina automática pica-hielo Bar line[®].
- Guillotina.
- Material quirúrgico diverso para la extracción de tejidos: guantes, bisturí, tijeras, pinzas.
- Otros materiales de tipo fungible, suero fisiológico, viales, papel de filtro, etc.

Reactivos químicos: Los reactivos químicos utilizados fueron de la mayor pureza disponible, y se conservaron según las condiciones óptimas indicadas por el comerciante.

MÉTODO

Las membranas celulares y mitocondriales se aislaron a partir de los tejidos por centrifugación diferencial. Se determinó la fluidez por espectroscopía de fluorescencia, utilizando TMA-DPH como marcador fluorescente y se expresó como el inverso de la polarización medida (1/P). La concentración de malonildialdehído y 4-hidroxialquenos (MDA + 4-HDA) y el contenido carbonilo proteico fueron determinados en los homogeneizados de los tejidos para valorar la peroxidación lipídica y la oxidación proteica, respectivamente.

Aislamiento de membranas celulares y mitocondriales

Previamente a la determinación de la fluidez, fue necesario realizar el aislamiento de las membranas celulares y mitocondriales. Se utilizó la metodología descrita por Graham (1997) con pequeñas modificaciones. El método se fundamenta en centrifugaciones sucesivas a distintas velocidades y tiempos. (Figura 10)

Tras descongelar y pesar los hígados, éstos fueron troceados con la utilización de un bisturí, sobre una placa de Petri mantenida en hielo:

1. Los tejidos se homogeneizaron en tampón HEPES 0,02 – KCl 0,14 M.
2. El homogeneizado se centrifugó a 1000 xg durante 10 min a 4°C para eliminar los restos de tejido sólido y los núcleos celulares.
3. A continuación, el sobrenadante se centrifugó a 50000xg durante 20 min a 4°C.
4. El precipitado que contenía las membranas, se resuspendió en HEPES, se homogeneizó y se volvió a centrifugar a 10000 xg durante 10 min a 4°C.
5. Tras esta centrifugación, el sobrenadante y el buffy coat se resuspendieron y centrifugaron a 50000xg durante 20 min a 4°C para obtener las membranas plasmáticas.
6. El precipitado se resuspendió en HEPES y se centrifugó a 10000 xg durante 10 min a 4°C, para obtener las mitocondrias.
7. Las membranas celulares y mitocondrias aisladas, se resuspendieron en TRIS 0,05 M, fueron distribuidas en alícuotas y conservadas a -80 °C hasta la realización de los ensayos.

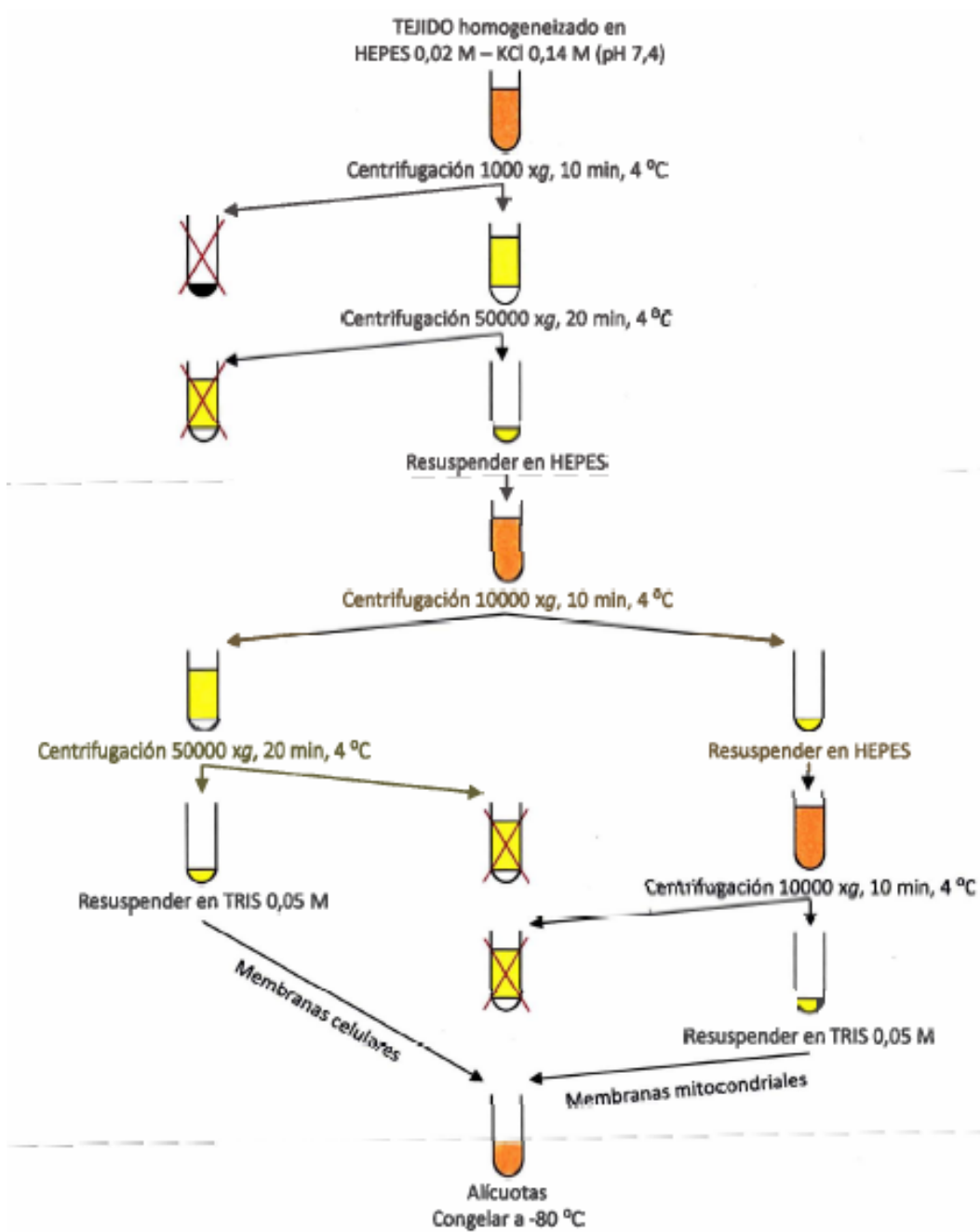


Figura 10. Protocolo de aislamiento de membranas y mitocondrias en hígado.

Determinación de la concentración de proteínas

Todos los resultados de los indicadores de daño oxidativo obtenidos en este trabajo (fluidez de las membranas, concentraciones de MDA + 4-HDA y presencia de restos carbonilo) están referidos a la concentración de proteínas de las muestras analizadas, para posibilitar su comparación.

Para calcularla se utilizó el método de Bradford (1976), basado en la reacción entre el azul de Coomassie y los aminoácidos básicos, principalmente arginina, lisina e histidina. Esta reacción produce cambios de absorbancia a 595 nm que son directamente proporcionales a la concentración total de proteínas. (Figura 11)

En este método, la cantidad de proteínas totales de la muestra problema se obtuvo interpolando su valor de absorbancia en la curva patrón de albúmina bovina. Los valores de concentración de proteínas se expresaron en mg/mL. El programa utilizado fue Assay 4.0

Protocolo:

- Dispensar 2 alícuotas de 1 μ L del homogeneizado para la determinación de MDA + 4-HDA, carbonilación proteica o del purificado de membranas y mitocondrias.
- Añadir TRIS 0,02 M hasta completar 800 μ L.
- Dispensar 200 μ L de reactivo de Bradford de Bio-Rad (Azul brillante de Coomassie G- 250 al 0,01%, etanol al 4,7%, ácido ortofosfórico al 8,5% diluido en agua destilada).
- Agitar e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro.

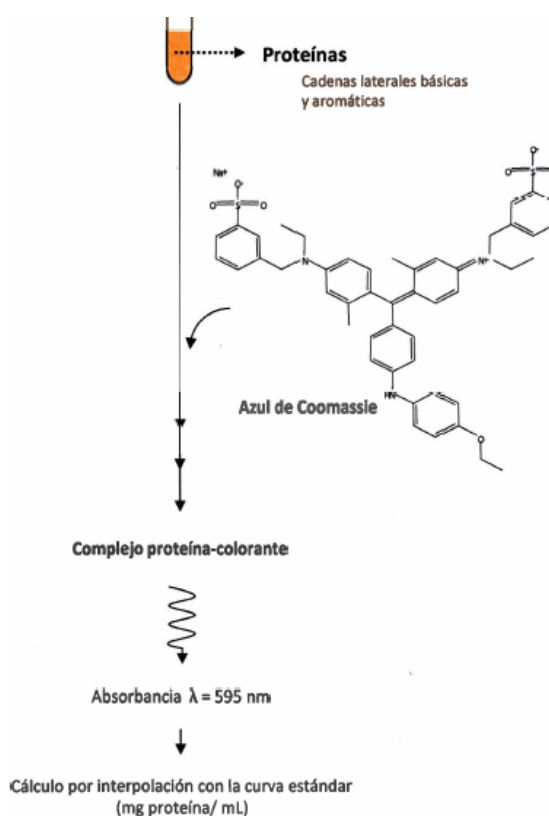


Figura 11. Determinación de la concentración de proteínas. Método Bradford.

Valoración de la fluidez de la membrana

La fluidez de las membranas celulares y mitocondriales se monitorizó por triplicado mediante espectroscopía de fluorescencia, usando TMA-DPH como marcador fluorescente (Yu y cols 1992) (Figura 12)

El método se basa en la incisión de esta molécula en las membranas intercalándose los fosfolípidos de la bicapa, reflejando de forma indirecta, la dinámica lipídica, ya que cuando es iluminado, emite fluorescencia (Zimmer y cols 1993).

Protocolo:

- En un tubo se dispensan 0,5 mg/mL de proteína de membranas, calculados por el método de Bradford.
- Añadir 1 µL de TMA-DPH 25 µM.
- Añadir tampón TRIS 0,05 M hasta completar 3 mL/tubo y agitar vigorosamente.
- Incubar durante 30 min a 37 °C con agitación.
- Colocar los tubos en baño de agua a temperatura ambiente hasta su lectura.
- Agitar para resuspender las membranas.
- Lectura en el espectroscopio de fluorescencia a 360 nm de excitación y 430 nm de emisión.
- Calcular la polarización (P) según la ecuación:

$$P = \frac{IV_V - GIV_H}{IV_V + GIV_H}$$

* I es la intensidad de emisión de la luz polarizada verticalmente, medida por un detector orientado en paralelo (IVV) o perpendicular (IVH) al plano de excitación, y G es un factor de corrección para el sistema óptico del espectroscopio.

- El resultado se calculó por la media aritmética de 30 mediciones independientes, y la fluidez en las membranas se expresó como el inverso de la polarización ($1/P$) (Yu y cols., 1992; Lee y cols., 1999)

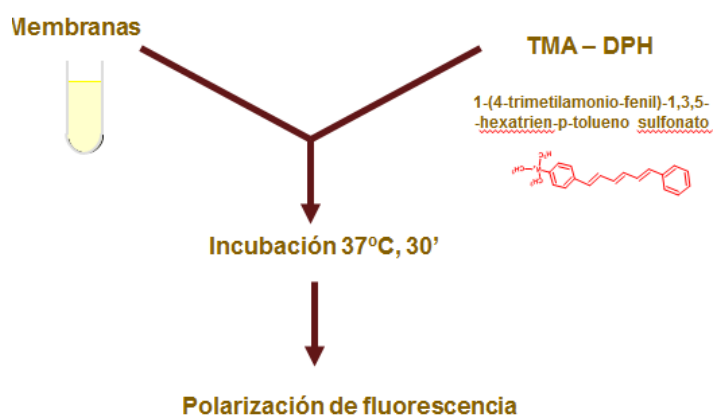


Figura 12. Protocolo MDA- DPH de medición de fluidez de membrana.

Análisis estadísticos

Los resultados ergométricos y analíticos obtenidos fueron tratados estadísticamente con el programa informático StatView 5.0.1.

Se realizaron dos estudios estadísticos, el primero consistió en la descripción de cada variable mediante dos parámetros: la media aritmética, como medida de la tendencia central, y el error estándar, como una medida de la dispersión. Por ello, los resultados se expresaron como media aritmética \pm error estándar; posteriormente, una vez comprobado por el test de Kolmogorov Smirnov que los valores de las variables seguían una distribución normal se realizó un estudio inferencial para comprobar si las diferencias entre las medias aritméticas de las variables eran o no estadísticamente significativas, lo que se logró aplicando el test de la t de Student para datos no pareados. El nivel de significación aceptado fue $p \leq 0,05$.

El programa informático utilizado para representar gráficamente los resultados fue GraphPad Prism versión 5.00.

RESULTADOS

Fluidez en la membrana celular

En el grupo completo de animales de estudio, no se obtuvieron diferencias significativas a los cinco meses de edad en la fluidez de membranas celulares aisladas del hígado entre ratones con envejecimiento acelerado y los resistentes. (Figura 13)

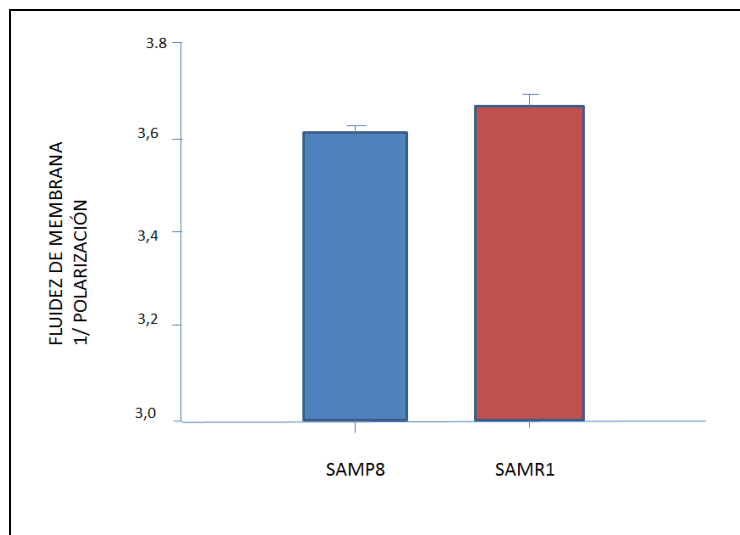


Figura 13. Las barras representan la media aritmética \pm error estándar en la fluidez de la membrana con envejecimiento acelerado (P8) y resistentes (R1). No existen diferencias significativas.

Fluidez en la membrana mitocondrial

Se ilustra en la siguiente imagen los efectos del envejecimiento acelerado sobre la fluidez de membranas mitocondriales. (Figura 14)

Como puede observarse, hubo un claro descenso de la fluidez mitocondrial en el grupo con envejecimiento acelerado (SAMP8) respecto a los controles (SAMR1).

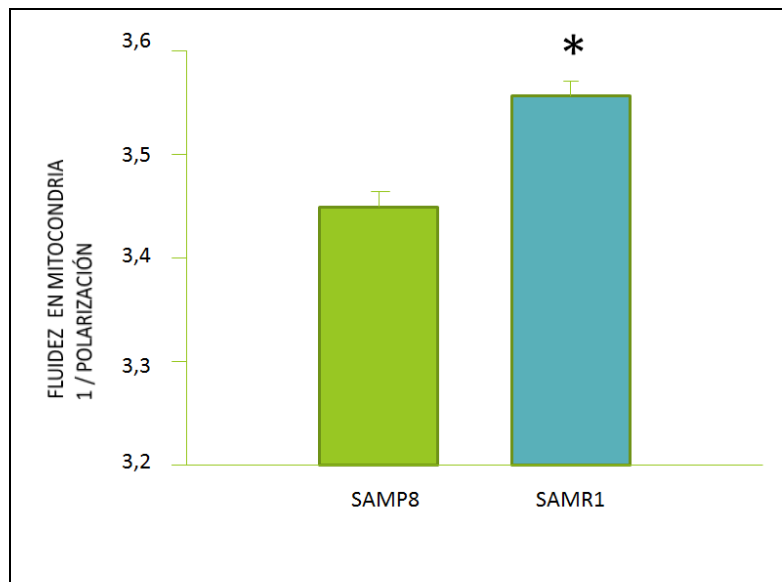


Figura 14. Fluidez de membrana en las mitocondrias hepáticas de ratones con envejecimiento acelerado de 5 meses de edad.

*El * muestra diferencias significativas*

DISCUSIÓN

Se decidió utilizar el modelo de ratones con envejecimiento acelerado porque constituyen un modelo atractivo en la investigación sobre el envejecimiento ya que muchas de las modificaciones fisiopatológicas que se producen durante el envejecimiento en estos ratones son similares a las producidas en el ser humano (Takeda, 1999). Respecto a la elección de cinco meses como la edad utilizada, se fundamenta en que los ratones SAMP8 se describen signos de estrés oxidativo a la edad de dos a cinco meses siempre en comparación con los ratones SAMR1 de la misma edad (Yasui y cols., 2003).

Es un hecho aceptado que las membranas son estructuras dinámicas y fluidas. La membrana celular se comporta como un fluido bidimensional anisotrópico donde las moléculas lipídicas y proteicas que lo constituyen se desplazan libremente en cualquier dirección del plano de la membrana, a diferencia de la viscosidad que es la resistencia al movimiento (Zimmer y Freisleben, 1988).

La membrana biológica requiere un estado fluido para desarrollar correctamente sus funciones. Existe un grado de fluidez óptima para el cumplimiento de las funciones específicas y su alteración modifica su función y origina patología (Reiter, 1998). Tiene que ser regulada con precisión. Algunos procesos de transporte y algunas actividades enzimáticas pueden detenerse cuando la viscosidad de la bicapa se incrementa experimentalmente más allá de un nivel umbral. De este modo, conocer la estructura y las propiedades físicas de la bicapa constituye la base para explicar multitud de procesos fisiológicos relacionados directa o indirectamente con la membrana. El transporte de iones y nutrientes, los procesos de transducción de señales que utilizan receptores localizados de membrana, la acción de enzimas como las ATPasas o la adenilato ciclasa, la aglutinación plaquetaria, la fagocitosis, algunas funciones relacionadas con la inmunidad, etc. Son buenos ejemplos de actividades celulares moduladas por el comportamiento físico de los lípidos de la membrana (Fischhoff y Vanderkkoij, 1975; Cooper y Hamilton, 1977; Heron y cols., 1980; Stubbs y Smith, 1984; Houslay, 1985; Tomita-Yamaguchi y cols., 1991; Viani y cols., 1991; Vlasic y cols., 1993; Sunshine y McNamee, 1994; Dumas y cols., 1997).

Podemos afirmar que los datos de nuestro estudio son coincidentes con las teorías de envejecimiento fisiológico, en las que se describen descensos de la fluidez de microsomas hepáticos (Reiter y cols., 1999) y en otros tipos de membranas (Yu y cols., 1992; Yu, 1994; Meccoci

Una cuestión importante a dilucidar es el análisis de cuáles son las causas que determinan la aparición de esta rigidez en las membranas celulares durante el envejecimiento. Entre ellas destaca el estrés oxidativo. Varios trabajos describen aumentos de la peroxidación lipídica en ratones SAMP8 causados por el envejecimiento acelerado (Liu y Mori, 1993; Matsugo y cols., 2000; Nomura y cols., 1989). Por ello, se relaciona que la peroxidación lipídica provoca cambios estructurales en las membranas celulares y afectan a la dinámica lipídica (García y cols., 1997; Yu y Chung., 2006).

Respecto a la composición de la membrana, el estrés oxidativo provoca una caída en la proporción de ácidos grasos poliinsaturados/saturados que hay en la membrana (Curtis y cols., 1984; Viani y cols., 1991), como consecuencia de la mayor susceptibilidad que presentan los ácidos grasos poliinsaturados al estrés oxidativo. (Gutteridge, 1995). Así, también se asocia el descenso en la fluidez durante el envejecimiento por aumento en la concentración de ácidos grasos saturados en la membrana (Hubbart y Garratt, 1980).

Una segunda causa es la formación de nuevas interacciones por las uniones tipo covalente entre lípidos y entre éstos y proteínas que pueden limitar el movimiento por productos de la peroxidación lipídica como el malonildialdehído (Schoroeder, 1984; Chen y Yu, 1994).

Otra de las causas que propicia el envejecimiento es el aumento del colesterol. En relación con la composición, Ghost y cols. (1993) describieron una mayor rigidez debido al descenso de la concentración de fosfolípidos, en consecuencia de un aumento de la ratio molar colesterol/fosfolípido.

Finalmente, la limitación de movimiento de los fosfolípidos y consecuente pérdida de asimetría funcional en la bicapa lipídica. (Schroeder, 1984; Chen y Yu, 1994; Paniagua y cols. 2003)

En la experiencia de la investigación, el estrés oxidativo tanto en modelo in vivo como in vitro, provocan rigidez tanto en los microsomas(García y cols.,1997,1998,1999,2000; Karbownik y cols., 2000a, 2000b, 2000c, 2001b; Calvo y cols., 2001),membranas celulares (Ochoa y cols.,2003; Reyes -González y cols., 2009; Aranda y cols.,2010; García y cols., 2001; García-Gil y cols., 2012)y mitocondrias (García y cols., 2010). Cabe destacar que nuestros resultados obtenidos pertenecen a valores en membranas de mitocondrias, demostrando correlación con la idea de que son las

principales fuentes de producción de radicales libres en seres vivos (Yu, 1994)

Estos hallazgos justificarían la desestructuración de la membrana y su consiguiente disfunción.

Por ello, se concluye que el envejecimiento fisiológico causa estrés oxidativo (Harman, 1956; Barber y Berheim, 1967; Sohal y Weidrich, 1996) y un descenso en la fluidez de las membranas biológicas.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos a partir de membranas mitocondriales hepáticas demuestran un descenso significativo de la membrana mitocondrial de los ratones con envejecimiento acelerado SAMP8, respecto a los ratones SAMR1.

Estos resultados contribuyen a mejorar el conocimiento existente de la dinámica de la membrana lipídica y proponer estos conocimientos como nueva diana de nuevas medidas en su prevención o tratamiento en contra del envejecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

-
- Abrass I. The Biology and Physiology of Aging. West J Med 1990.12; 153: 641- 645.
- Aranda M, Albendea CD, y cols. In vivo hepatic oxidative stress because of carbon tetrachloride toxicity: protection by melatonin and pinoline. J Pineal Res 2010. 49(1):78-85.
- Barber AA, Bernheim F. Lipid peroxidation: its measurement, occurrence, and significance in animal tissues. Adv Gerontol Res 1967. 2: 355-403.
- Biesalski HK. Free radical theory of aging. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2002. 5(1), 1-3
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976. 72:248-54.
- Castelluccio C, Barraca A, y cols. Mitochondrial activities of heart during aging. Mech Ageing Dev 1994. (76):73-88.
- Chen, J.J. y B.P. Yu .Alteraciones in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. Free Radic Biol Med 1994.17(5):411-8.
- Cooper RA. Abnormalities of cell – membrane fluidity in the pathogenesis of disease. New Engl J Med 1977:297:371-377.
- Cooper TG, y DW Hamilton. Phagocytosis of spermatozoa in the terminal region and gland of the vas deferens of the rat.” Am J Anat 1977. 150 (2):247-67.
- Curtis, M.T., Gilfor, D. y J.L. Farber. (1984). Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes. Arch Biochem Biophys .1984. 341(1):34-9.
- Davson H, Danielli JF. Studies on the permeability of erythrocytes: The alleged reversal of ionic permeability at alkaline reaction. Biochem 1936.30(2):316-20
- Dumas D, Muller S, y cols. Membrane fluidity and oxygen diffusion in cholesterol-enriched erythrocyte membrane. Arch Biochem Biophys 1997. 341(1):34-9.
- Fenton, M., H.L. Huang, y cols. Early atherogenesis in senescence-accelerated mice. Exp Gerontol .2004.39 (1):115-22.

Fischkoff, S. y J.M. Vanderkooi. Oxygen diffusion in biological and artificial membranes determined by the fluorochrome pyrene. *J Gen Physiol* 1975.65(5):663-76.

Fridovich, I. Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle. *Photochem Photobiol* 1978. 28 (4-5): 733-41.

Gallagher-M; Colombo-PJ. Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. *Current Opinion in Neurobiology* 1995.5(2): 161-8

Garcia, J.J., Reiter, y cols. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett.*1997. 408 (3): 297-300.

García, J.J., Reiter, y cols. Melatonin enhances tamoxifen's to prevent the reduction in microsomal membrane fluidity induced by lipid peroxidation. *J Membr Biol* 1998. 162(1):59-65.

García J.J., Reiter RJ, y cols .Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr* 1999. 31 (6):609-16.

García , J.J., Reiter , y cols . 5-methoxytryptophol preserves hepatic microsomal membrane fluidity during oxidative stress. *J Cell Biochem* 2000.76(4):651-7.

García , J.J., Reiter , y cols . N-acetylserotonin suppresses hepatic microsomal membrane rigidity associated with lipid peroxidation. *Eur J Pharmacol* 2001. 428(2):169-75.

García , J.J.,G. Pinol-Ripoll, y cols. Melatonin reduces membrane rigidity and oxidative damage in the brain of SAMP8 mice. *Neurobiol Aging* .2010. 32(11):2045-54.

Garcia-Gil FA, Albendea CD y cols. Altered cellular membrane fluidity levels and lipid peroxidation during experimental pancreas transplantation. *J Bioenerg Biomembr* 2012. 44(5):571-7.

Ghosh C, Dick RM, et al. Iron/ascorbate- induced lipid peroxidation changes membrane fluidity and muscarinic cholinergic receptor binding in rat frontal cortex. 1993. *Neurochem Int* 23(5):479-84.

Graham JM. Homogenization of tissues and cells. En *subcellular fractionation: A practical approach*. J.M. Graham y D Rickwood(editors). Oxford, UK, Oxford University Press (IRL Press

Gutteridge J. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem. 1995;41(12Pt2):1819-28.

Harman D. Ageing: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol. 1956;11(3):298-300.

Heron DS, Shinitzky M, y cols. Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes. Proc Natl Acad Sci USA 1980;77(12): 7463-7.

Hillard CJ, Harris RA, Bloom AS. Effects of cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies. J Pharmacol Exp Ther 1985;232:579-589.

Hosokawa M. A higher oxidative status accelerates senescence and aggravates age-dependent disorders in SAMP strains of mice. Mech Ageing Dev 2002; 123(12):1553-61.

Houslay MD. Reagulation of adenylate cyclase (ec 4.6.1.1.) activity by its lipid environment. Proc Nutr Soc 1985; 44(2):157-65.

Hubbard RE, Garratt CJ. The composition and fluidity of adipocyte membranes prepared from young and adult rats. Biochim Biophys Acta 1980; 600(3):701-4.

Janero, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury," Free Radic Biol Med 1990;9 (6):515-40.

Karbownik M, Reiter RJ, y cols. Protective effects of melatonin against oxidation of guanine bases in DNA and decreased microsomal membrane fluidity in rat liver induced by whole body ionizing radiation. Moll Cell Biochem. 2000a;211(1-2):137-44.

Karbownik M, Reiter RJ, y cols. Melatonin reduces rat hepatic macromolecular damage due to oxidative stress caused by delta- aminolevulinic acid. Biochem Biophys Acta 2000b;1523(2-3):140-6.

Karbownik M, Reiter RJ, y cols. Melatonin reduces phenylhydrazine –induced oxidative damage to cellular membranes: evidence for the involvement of iron. Int Biochem Cell Biol 2000c.

32(10):1045-54.

Karbownik M, Reiter RJ, y cols. Indole -3- propionic acid, a melatonin-related molecule, protects hepatic microsomal membranes from iron-induced oxidative damage: relevance to cancer reduction. *J Cell Biochem* 2001a. 81(3):507-13.

Karbownik M, García JJ, y cols. Carcinogen-induced, free radical- mediated reduction in microsomal membrane fluidity: reversal by indole -3- propionic acid. *J Bioenerg Biomembr* 2001. 33(1):73-8.

Lee J, Yu BP, y cols. Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. *Free Radic Biol Med* 1999. 26(3-4):260-5.

Liu J, Mori A. Age-associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM) :a comparison with ddY mice. *Mech Ageing Dev* 1993. 71(1-2):23-30.

Lopez LC, Escames G, Ortiz F, Ros E, Acuna-Castroviejo D Melatonin restores the mitochondrial production of ATP in septic mice. *Neuro Endocrinol Lett.* 2006a. 27:623–630

Martin M, Macias M, León J, Escames G, Khaldy H y Acuña-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. In *Biochem Cell Biol.* 2002. 34(4):348-357.

Matsugo S, Kitagawa T, y cols. Age-dependent changes in lipid peroxide levels in peripheral organs, but not in brain, in senescence –accelerated mice. *Neurosci Lett.* 2000. 278(1-2):105-8.

Mazzanti L, Cester N, Meme E, Valiese H, Romanini C, Ferrera P. Marinelli F, Biagini G. Bertoli E, Lenaz G. Effects of general anesthesia on syncytiotrophoblast plasma membranes from human placenta. *Biochem Int* 1988;16:1095-1101.

Mecocci P, Beal MF, y cols. Mitochondrial membrane fluidity and oxidative damage to mitochondrial DNA in aged and DNA human brain. *MOL Chem Neuropathol* 1997. 31(1):53-64.

Miquel J, Economos AC, y cols. Mitochondrial role in cell aging. *Exp Gerontol.* 1998;15(6):575-91

Miquel J. an update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging. *Mutat Res.* 1992. 275(3-6):209-16.

Mori A, Utsumi K, y cols. Oxidative damage in the senescence –accelerated mouse. *Ann N y Acad Sci* 1998. 854:239-50.

Ochoa JJ, Vilchez MJ, y cols. Melatonin protects against lipid peroxidation and membrane rigidity in erythrocytes from patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery.

Reiter RJ, Tan D, y cols. Augmentation of indices of oxidative damage in life- long melatonin-deficient rats. *Mech Ageing Dev* 1999. 110(3):157-73.

Reyes-Gonzales MC, Fuentes- Broto L, y cols. Effects of tryptophan and 5-hydroxytryptophan on the hepatic cell membrane rigidity due to oxidative stress, *J Membr Biol* 2009. 231 (2-3):93-9.

Rodriguez MI, Escames G, y cols. Chronic melatonin treatment reduces the age-dependent inflammatory process in senescence-accelerated mice. *J Pineal Res* 2007. 42(3):272-9.

Rodriguez MI, Escames G, y cols. Improved mitochondrial function and increased life span after chronic melatonin treatment in senescent prone mice. *Exp Gerontol* 2008. 43(8):749-56.

Rice –Evans, Burdon R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res.* 1993. 32.(1):71-110.

Schoeder F. Role of membrane lipid asymmetry in aging. *Neurobiol Aging* 1984. 5(4):323-33.

Sies H, Melhorn R. Mutagenicity of nitroxide-free radicals. *Arch Biochem Biophys.* 1986. 251(1):393-6.

Singer SJ, Nicolson GL.(1972).” The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. “ *Science*:175:720-31.

Shinitzky M. Membrane fluidity and cellular function. In Shinitzky (ed): *Physiology of membrane fluidity*. Vol1. 1984. 1-51.

Stubbs CD, Smith AD. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty

acid composition in relation to membrane fluidity and function 1984. *Biochim Biophys Acta* 1984. 779(1):89-137.

Sunshine C, McNamee MG. lipid modulation of nicotinic acetylcholine receptor function: the role of membrane lipid composition and fluidity. *Biochim Biophys Acta* 1994. 1191(1):59-64.

Takeda T, Hosokawa M, y cols. A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 1981. 17(2):183-94.

Takeda T. Senescence-accelerated mouse (SAM): a biogerontological resource in aging research. *Neurobiol Aging* 1999. 20(2):105-10.

Tomita-Yamaguchi M, Rubio C, y cols. Regional influences on the physical properties of T cell membranes. *Life Sci* 1991. 48(5):433-8.

Viani P, Cervato G, y cols. Age-related differences in synaptosomal peroxidative damage and membrane properties. *J Neurochem* 1991. 56(1):253-8.

Vladimirov YA, Olenov VI, y cols. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv Lipid Res* 1980. 17:173-249.

Vlasic N, Medow S, y cols. Lipid fluidity modulates platelet aggregation and agglutination in vitro. *Life Sci* 1993. 53(13):1053-60.

Wiley J, Sons Ltd. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review *J. Pineal Res.* 2014; 56:225–237

Wiseman H. Quinn P. The antioxidant action of synthetic oestrogens involves decreased membrane fluidity: Relevance to their potential use as anticancer and cardioprotective agents compared to tamoxifen?. *Free Rad Res* 1994; 21:18-194.

Whiting KP, Brain PF, Restall CJ. Steroid hormone induced effects on membrane fluidity. *Biochem Soc T* 1995; 23:438S.

Yasui F, Ishibashi M, y cols. Brain lipid hydroperoxide level increases in senescence-accelerated mice at an early age. *Neurosci Lett* 2003. 350(1): 66-8.

Yu BP, Suescun EA, y cols. Effects of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction. *Mech Ageing Dev* 1992. 65(1):17-33.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994. 74(1):139-62.

Yu BP, Chung HY. Adaptative mechanisms to oxidate stress during aging. *Mech Ageing Dev* 2006.127(5):436-43.

Zimmer G, Thurich T, y cols. Membrane fluidity and vitamine E. *Vitamine E in Health and Disease*. L Packer y J. Fuchs (editors) New York, USA Marcel Dekker, Inc.1993:207-22.

Zubenko GS, Cohen BM. Effects of phenothiazine treatment on the physical properties of platelet membranes from psychiatric patients. *Biol Psychiatry* 1985;20:384-396.